(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-228655
(P2008-228655A)
(43)公開日　平成20年10月2日(2008.10.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B063
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/574	A	4C076
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 15 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-73155(P2007-73155)
(22)出願日　平成19年3月20日(2007.3.20)

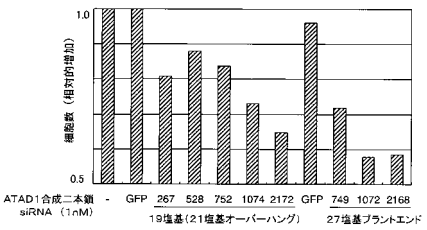
(71)出願人　504147254
国立大学法人愛媛大学
愛媛県松山市道後樋又１０番１３号
(74)代理人　110000040
特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(72)発明者　中城　公一
愛媛県東温市志津川　国立大学法人愛媛大学内
(72)発明者　浜川　裕之
愛媛県東温市志津川　国立大学法人愛媛大学内

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA12 CA01 CA09 CA11 CA20 FA10 GA11 HA12 HA17

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＡＤＡＴ１遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡ

(57)【要約】
【課題】ＡＤＡＴ１遺伝子を標的とする臨床応用可能なｓｉＲＮＡの提供
【解決手段】本発明のｓｉＲＮＡは、ＡＤＡＴ１遺伝子を特異的に標的とする二本鎖ｓｉＲＮＡであって、１９塩基対と２塩基の３’末端オーバーハングとからなる２１塩基の二本鎖ｓｉＲＮＡ、又は、２７塩基対からなるブラントエンドの二本鎖ｓｉＲＮＡである。本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、オフターゲット効果及びインターフェロン応答を回避しつつ、ＡＤＡＴ１遺伝子に特異的なＲＮＡｉを媒介できる。本発明のｓｉＲＮＡは、例えば、臨床応用が可能であり、ＡＤＡＴ１を標的分子とした医療や医薬組成物の分野、例えば、頭頸部癌を含むがん治療に関する治療や医薬組成物の分野で有用である。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＡＤＡＴ１遺伝子を標的とする二本鎖ｓｉＲＮＡであって、
１９塩基対と２塩基の３’末端オーバーハングとからなる２１塩基の二本鎖ｓｉＲＮＡ、又は、２７塩基対からなるブラントエンドの二本鎖ｓｉＲＮＡであり、
前記１９塩基対の配列が、配列表の配列番号１から５のいずれかの配列であり、
前記２７塩基対の配列が、配列表の配列番号６から８のいずれかの配列である二本鎖ｓｉＲＮＡ。
【請求項２】
前記３’末端オーバーハング部分の２塩基の配列が、ＴＴである請求項１記載の二本鎖ｓｉＲＮＡ。
【請求項３】
前記配列表の配列番号１から８の配列において、１若しくは数個の塩基が修飾され又は置換、付加若しくは欠失し、かつ、ＡＤＡＴ１遺伝子特異的なＲＮＡ干渉を誘導可能な請求項１又は２に記載の二本鎖ｓｉＲＮＡ。
【請求項４】
ＡＤＡＴ１特異的阻害組成物であって、請求項１から３のいずれか一項に記載の二本鎖ｓｉＲＮＡを含み、ＲＮＡ干渉によりＡＤＡＴ１遺伝子の発現を特異的に阻害するＡＤＡＴ１特異的阻害組成物。
【請求項５】
がん治療用の医薬組成物であって、請求項１から３のいずれか一項に記載の二本鎖ｓｉＲＮＡを含む医薬組成物。
【請求項６】
さらに、アテロコラーゲンを含む請求項５記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記がんが、頭頸部癌である請求項５又は６に記載の医薬組成物。
【請求項８】
ＡＤＡＴ１遺伝子のＡＤＡＴ１ｍＲＮＡ、ＡＤＡＴ１タンパク質、及び、ＡＤＡＴ１タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される腫瘍マーカーであって、被検試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者におけるがんの存在を示す腫瘍マーカー。
【請求項９】
腫瘍マーカーの使用方法であって、被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に請求項８記載の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する判定工程とを含む腫瘍マーカーの使用方法。
【請求項１０】
請求項８記載の腫瘍マーカーを検出するための検出キットであって、前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡを検出するためのプローブ及びプライマーの少なくとも一方であるポリヌクレオチド、前記ＡＤＡＴ１タンパク質を検出するための抗体、並びに、抗ＡＤＡＴ１タンパク質抗体を検出するための抗原及び抗体からなる群から選択される少なくとも一つを含む検出キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＡＤＡＴ１遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡに関する。
【背景技術】
【０００２】
現在、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ：ＲＮＡｉ）技術は、生命科学研究に頻繁に利用され、その有用性は広く確認されている。ＲＮＡｉとは、二本鎖ＲＮＡによって、その配列特異的にｍＲＮＡが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象をいう。２００１年に２１塩基の低分子二本鎖ＲＮＡが哺乳動物細胞内でＲＮＡｉを媒介

できることが報告されてより（非特許文献１参照）、ｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｃｅ　ＲＮＡ）は、標的遺伝子の発現抑制方法として頻用されている。また、より高いＲＮＡｉ効果を得るためのｓｉＲＮＡの配列選択基準についても報告されている（非特許文献２参照）。ＲＮＡｉ技術は、医薬品への応用や、がんを含む種々の難治性疾患の治療への応用が期待されている。

【０００３】

しかしながら、ｓｉＲＮＡを臨床応用する場合、インターフェロン応答の問題がある。すなわち、高濃度の合成ｓｉＲＮＡを細胞内に導入したり、細胞内において高濃度にｓｉＲＮＡを発現させたりすると、インターフェロン応答が誘導され非特異的な発現阻害や非特異的な細胞増殖阻害が起こる。現在では、１０ｎＭ以上の合成ｓｉＲＮＡを細胞内導入するとインターフェロン応答が誘導されることが知られている。

【０００４】

さらに、ｓｉＲＮＡを臨床応用する場合、オフターゲット効果の問題がある。すなわち、ｓｉＲＮＡは、標的遺伝子の発現を抑制できる優れた技術ではあるが、標的遺伝子以外の類似標的配列を有する遺伝子の発現も抑制することが明らかにされている（非特許文献３参照）。

【０００５】

他方、ＡＤＡＴ１（ａｄｅｎｏｓｉｎｅ　ｄｅａｍｉｎａｓｅ，ｔＲＮＡ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　１）遺伝子は、ＲＮＡに作用するアデノシン脱アミノ酵素であるＡＤＡＲ（ａｄｅｎｏｓｉｎｅ　ｄｅａｍｉｎａｓｅ　ａｃｔｉｎｇ　ｏｎ　ＲＮＡ）ファミリー属し、ｔＲＮＡのＲＮＡ編集に関与するタンパク質をコードする（非特許文献４）。

【０００６】

しかしながら、これまでに、ＡＤＡＴ１遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡであって、上述したインターフェロン応答の問題や、オフターゲット効果の問題を回避できる臨床応用可能なｓｉＲＮＡは報告されていない。また、ＡＤＡＴ１ががんの治療標的分子として有用であるという報告はない。

【非特許文献１】Ｅｌｂａｓｈｉｒ　ＳＭら、「Ｄｕｐｌｅｘｅｓ　ｏｆ　２１－ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ＲＮＡｓ　ｍｅｄｉａｔｅ　ＲＮＡ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ　ｉｎ　ｃｕｌｔｕｒｅｄ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ.」　Ｎａｔｕｒｅ　４１１（６８３６）：４９４－４９８，２００１.

【非特許文献２】Ｒｅｙｎｏｌｄｓ　Ａら、「Ｒａｔｉｏｎａｌ　ｓｉＲＮＡ　ｄｅｓｉｇｎ　ｆｏｒ　ＲＮＡ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ.」　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２２（３）：３２６－３３０，２００４.

【非特許文献３】Ｊａｃｋｓｏｎ　ＡＬら、「Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ　ｒｅｖｅａｌｓ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｇｅｎｅ　ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　ｂｙ　ＲＮＡｉ.」　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２１（６）：６３５－６３７，２００３.

【非特許文献４】Ｍａａｓ　Ｓら、「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　ｈｕｍａｎ　ｔＲＮＡ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｄｅｎｏｓｉｎｅ　ｄｅａｍｉｎａｓｅ　ｒｅｌａｔｅｄ　ｔｏ　ｔｈｅ　ＡＤＡＲ　ｆａｍｉｌｙ　ｏｆ　ｐｒｅ－ｍＲＮＡ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｅｎｚｙｍｅｓ.」　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９６（１６）：８８９５－８９００，１９９９.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

そこで、本発明は、ＡＤＡＴ１遺伝子を特異的に標的とする臨床応用可能なｓｉＲＮＡの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

前記目的を達成するために、本発明のｓｉＲＮＡは、ＡＤＡＴ１を標的とする二本鎖ｓｉＲＮＡであって、１９塩基対と２塩基の３’末端オーバーハングとからなる２１塩基の二本鎖ｓｉＲＮＡ、又は、２７塩基対からなるブラントエンドの二本鎖ｓｉＲＮＡであり、前記１９塩基対の配列が、配列表の配列番号１から５のいずれかの配列であり、前記２７塩基対の配列が、配列表の配列番号６から８のいずれかの配列である二本鎖ｓｉＲＮＡである。

【発明の効果】

【０００９】

本発明者らは、まず、頭頸部癌などのがんの治療標的分子について鋭意研究を重ね、ＡＤＡＴ１が頭頸部癌などのがんの治療標的分子となりうることを見出した。すなわち、ヒト全遺伝子を対象にした網羅的遺伝子発現解析を行い、培養ヒト正常角化上皮細胞及び正常口腔粘膜組織には発現が認められず、培養ヒト頭頸部癌細胞及び頭頸部癌組織などの悪性腫瘍においてのみ共通して発現が認められる遺伝子として、ＡＤＡＴ１遺伝子を同定した。

【００１０】

次に、本発明者らは、ＡＤＡＴ１遺伝子のｓｉＲＮＡについてさらに鋭意研究を重ね、１ｎＭという使用濃度であっても十分にＲＮＡｉ効果を発揮でき、インターフェロン応答の誘導回避が可能な二本鎖ｓｉＲＮＡを見出した。そして、本発明者らは、ＡＤＡＴ１遺伝子のｓｉＲＮＡについて、ＢＬＡＳＴサーチを駆使し、ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡの非翻訳領域を含めた全配列より他の遺伝子にホモロジーを示さない配列を標的配列として選択し、オフターゲット効果を回避できる二本鎖ｓｉＲＮＡを見出し、本発明に到達した。

【００１１】

本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡによれば、例えば、１ｎＭという使用濃度であっても十分にＲＮＡｉ効果を発揮できるから、好ましくは、インターフェロン応答を回避して使用できる。また、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、ＡＤＡＴ１に特異的であるから、好ましくは、オフターゲット効果を回避して使用できる。したがって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、好ましくは、臨床応用可能であり、例えば、がんの治療、がん治療の医薬組成物、ＡＤＡＴ１に特異的な阻害組成物等に利用できる。

【００１２】

さらにまた、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡがＲＮＡｉ効果を発揮するＡＤＡＴ１遺伝子は、上述のとおり、頭頸部癌などの悪性腫瘍の治療標的分子となりうるから、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、好ましくは、頭頸部癌などの悪性腫瘍の腫瘍マーカーに利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１３】

本発明の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡにおいて、前記３’末端オーバーハング部分の２塩基の配列は、ＴＴ（チミン・チミン）であることが好ましい。

【００１４】

本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、その他の態様として、前記配列表の配列番号１から８の配列において、１若しくは数個の塩基が修飾され又は置換、付加若しくは欠失した二本鎖ｓｉＲＮＡであって、ＡＤＡＴ１遺伝子に特異的なＲＮＡ干渉を誘導可能な二本鎖ｓｉＲＮＡである。

【００１５】

本発明のＡＤＡＴ１特異的阻害組成物は、ＲＮＡ干渉によりＡＤＡＴ１遺伝子の発現を特異的に阻害するＡＤＡＴ１遺伝子に特異的な阻害組成物であって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを含む。

【００１６】

本発明の医薬組成物は、がん治療用の医薬組成物であって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの少なくとも１つを含む医薬組成物である。本発明の医薬組成物は、さらに、アテロコラーゲンを含むことが好ましい。本発明の医薬組成物において、治療用途の対象となるがんは、例えば、頭頸部癌などである。

【００１７】
本発明の腫瘍マーカーは、ＡＤＡＴ１遺伝子のＡＤＡＴ１ｍＲＮＡ、ＡＤＡＴ１タンパク質、及び、ＡＤＡＴ１タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される腫瘍マーカーであって、被検試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者におけるがんの存在を示す腫瘍マーカーである。前記腫瘍マーカーは、頭頸部癌の存在を示すものであることが好ましい。
【００１８】
本発明の腫瘍マーカーの使用方法は、被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に本発明の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する判定工程とを含む腫瘍マーカーの使用方法である。前記腫瘍マーカーは、頭頸部癌の存在を示すものであることが好ましい。
【００１９】
本発明の検出キットは、腫瘍マーカーを検出するための検出キットであって、前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡを検出するためのプローブ及びプライマーの少なくとも一方であるポリヌクレオチド、前記ＡＤＡＴ１タンパク質のいずれかを検出するための抗体、並びに、抗ＡＤＡＴ１タンパク質抗体を検出するための抗原及び抗体からなる群から選択される少なくとも一つを含む検出キットである。前記腫瘍マーカーは、頭頸部癌の存在を示すものであることが好ましい。
【００２０】
次に、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡについて詳しく説明する。
【００２１】
まず、本発明において、「ＡＤＡＴ１遺伝子」とは、上述のとおり、ｔＲＮＡ特異的アデノシン脱アミノ酵素１（ａｄｅｎｏｓｉｎｅ ｄｅａｍｉｎａｓｅ，ｔＲＮＡ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ １）の遺伝子であって、ＲＮＡに作用するアデノシン脱アミノ酵素であるＡＤＡＲ（ａｄｅｎｏｓｉｎｅ ｄｅａｍｉｎａｓｅ ａｃｔｉｎｇ ｏｎ ＲＮＡ）ファミリー属し、ｔＲＮＡのＲＮＡ編集に関与するタンパク質をコードする遺伝子である。本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの標的となるＡＤＡＴ１遺伝子としては、好ましくは、ヒトＡＤＡＴ１遺伝子であって、その配列は、例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号（２００６年１１月１７日付）ＮＭ＿０１２０９１などから入手可能であって、ヒトＡＤＡＴ１タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号（２００６年１１月１７日付）ＮＰ＿０３６２２３などから入手可能である。
【００２２】
本発明において、「ｓｉＲＮＡ」とは、ＲＮＡｉを媒介可能な短鎖のＲＮＡ分子であって、一般には、２１塩基～２７塩基の二本鎖低分子ＲＮＡをいう。
【００２３】
本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、２つの態様がある。第１の態様は、１９塩基対と２塩基の３’末端オーバーハングとからなる２１塩基の二本鎖ｓｉＲＮＡであり、第２の態様は、２７塩基対からなるブラントエンドの二本鎖ｓｉＲＮＡである。前記１９塩基対及び前記２７塩基対の一方の鎖の配列を、下記表１に示す。下記表において、左欄が、それぞれのｓｉＲＮＡのコードネームであり、右欄が、ＳｅｑＩＤ、すなわち、配列表の配列番号である。
【００２４】

【表１】

（表1）

21塩基（オーバーハング）	配列	SeqID
267	GGUCAUAGCCAGAAGGAGU	1
528	CCUGGAAGCUCCUGGAAAU	2
752	CCAAAGUGACAGACGUUUA	3
1074	CUUCGGAGUUCAAGAAUUA	4
2172	CAGCAAAGAAUGAAGGCAA	5
27塩基（ブラントエンド）		
749	GUGCCAAAGUGACAGACGUUUAUAGAA	6
1072	GGCUUCGGAGUUCAAGAAUUAAAAAUA	7
2168	AGCCAGCAAAGAAUGAAGGCAACAAAG	8

【００２５】
ここで、「特異的に標的とする」とは、オフターゲット効果が抑制され、好ましくはオフターゲット効果がないことをいう。すなわち、ＡＤＡＴ１遺伝子以外の遺伝子にＲＮＡｉ効果を好ましくは及ぼすことがない、非常に高い特異性を示すことをいう。
【００２６】
本発明の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡにおいて、前記３’末端のオーバーハングとは、５’末端から１９ｍｅｒが相補的な配列である２本の２１ｍｅｒのＲＮＡ鎖が対合して二本鎖を形成したとき１９塩基対の両端から突出する３’末端の２ｍｅｒの部分をいう。前記３’末端オーバーハングの２塩基の配列は、例えば、両端ともＴＴ（チミン・チミン）が好ましい。なお、前記３’オーバーハングの２塩基の配列は、これに制限されず、ＲＮＡｉ効果や細胞増殖抑制効果に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、任意の天然核酸塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシシル）、並びに、天然及び人工の公知の修飾塩基であってもよい。また、前記３’末端オーバーハング部分のヌクレオチドは、通常、リボヌクレオチドを使用できるがこれに制限されず、ＲＮＡｉ効果や細胞増殖抑制効果に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、その他の公知のヌクレオチド類似体を使用してもよい。さらに、本発明の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡは、必要に応じて、前記３’末端オーバーハングに代えて、５’末端オーバーハングとしてもよい。
【００２７】
本発明の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡの１９塩基対の配列は、上記表１に記載の、２６７、５２８、７５２、１０７４、及び、２１７２（それぞれ、配列表の配列番号１～５の配列）の５種類が使用できるが、好ましくは、１０７４及び２１７２であって、より好ましくは、２１７２である。
【００２８】
本発明の２７塩基ブラントエンド二本鎖ｓｉＲＮＡは、２７ｍｅｒの相補的な２本のＲＮＡ鎖が対合して形成した二本鎖であるから、その末端は平滑である。本発明の２７塩基ブラントエンド二本鎖ｓｉＲＮＡの２７塩基対の配列は、上記表１に記載のとおり、７４９、１０７２、及び、２１６８（それぞれ、配列表の配列番号６～８）の３種類が使用できるが、好ましくは、１０７２及び２１６８であって、より好ましくは、１０７２である。
【００２９】
本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの塩基対部分の配列（配列表の配列番号１～８）は、ＡＤＡＴ１遺伝子特異的なＲＮＡｉを誘導できる範囲において、１又は数個の塩基が修飾され、又は置換、付加若しくは欠失したものであってもよい。前記数個とは、例えば、２、３、４個である。
【００３０】

本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの製造方法は、インビトロで化学的又は酵素的に合成しても、又は、インビボで合成してもよく、その製法は特に制限されないが、なかでも、従来公知の方法により化学合成して製造することが好ましい。合成二本鎖ｓｉＲＮＡであれば、濃度調節が容易となり臨床応用に際してインターフェロン応答の回避が容易となる。また、コンタミネーションの防止が容易であり安全性においても利点がある。例えば、本発明の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡの２１７２を製造する場合、まず、配列表の配列番号５の配列の３’末端に２塩基のオーバーハングを加えた２１ｍｅｒのＲＮＡ鎖、及び、前記配列番号５の配列の相補配列の３’末端に２塩基のオーバーハングを加えた２１ｍｅｒのＲＮＡ鎖をそれぞれ化学合成する。次に、前記２本のＲＮＡ鎖が対合する条件で対合させ、本発明の２１塩基のオーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡを得る。使用に際しては、必要に応じて、従来公知の方法により適宜精製することが好ましい。

【００３１】

したがって、本発明は、その他の態様として、二本鎖ｓｉＲＮＡの製造方法であって、前記二本鎖ｓｉＲＮＡが、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡであり、配列表の配列番号１～５、のいずれかの配列及びその相補配列にそれぞれ２塩基のオーバーハングを加えた２本のＲＮＡ鎖、又は、配列表の配列番号６～８のいずれかの配列及びその相補配列の２本のＲＮＡ鎖を合成する合成工程と、合成した前記２本のＲＮＡ鎖を対合して二本鎖ＲＮＡとする対合工程とを含む製造方法を含む。

【００３２】

次に、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの使用方法について説明する。本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、インビトロにおいて細胞や組織に対して使用できることに加えて、ヒトに対して臨床応用可能である。ヒトへの投与方法は、特に制限されず、従来公知のデリバリーシステムを利用できる。しかしながら、例えば、口腔癌等のように、直視直達の可能な部位に対しては、例えば、アテロコラーゲンを用いた局所投与法が好ましい。前記アテロコラーゲンは、例えば、局所止血剤として既に臨床応用されており、また、前記アテロコラーゲンを用いたｓｉＲＮＡの局所投与法は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）を分子標的とした動物実験でその有意性が示されている（Ｔａｋｅｉ　Ｙら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６４（１０）：３３６５－３３７０、２００４）。

【００３３】

また、その他のデリバリーシステムとして、生体内での分解を防ぎ、細胞内透過性を高めるための化学修飾（Ｒｏｓｓｉ　ＪＪ．、Ｎａｔｕｒｅ　４３２（７０１４）：１５５－１５６、２００４；　Ｓｏｕｔｓｃｈｅｋ　Ｊら、Ｎａｔｕｒｅ　４３２（７０１４）：１７３－１７８、２００４）やカチオニックリポソーム（Ｙａｎｏ　Ｊら、Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　１０（２２）：７７２１－７７２６、２００４）を用いたデリバリーシステムを利用しても良い。さらに、必要に応じて、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを発現するｓｉＲＮＡ発現ベクターを構築し、遺伝子治療技術を利用したデリバリーシステムを利用することもできる。

【００３４】

本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、がんの治療や、がん治療の用途に使用する医薬組成物若しくはそれらの製造に使用することが好ましい。とりわけ、前記がんとしては、例えば、頭頸部癌があげられる。本発明において、「頭頸部癌」とは、脳と眼を除いた首から上にできるがんをいい、一般的に、口腔癌、鼻副鼻腔癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、頸部腫瘍、耳の癌を含む。なかでも、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、口腔癌の治療や、口腔癌の治療の用途に使用する医薬組成物若しくはそれらの製造に使用することが好ましい。口腔癌とは、一般に、歯肉、舌、頬部、口蓋、口底、唾液腺等の口腔を構成する部位の粘膜により発生するがんをいう。口腔は、摂食、構音等、日常生活を営む上で極めて重要な機能を担っている。手術手技の進歩により進行口腔癌の治療成績は向上しているものの、治療後のＱＯＬ（生活の質）の低下は避けられない。したがって、進行口腔癌に対しては特に手術を用いない根治性の高い新規治療法の開発が急務となっている。マウスの骨肉腫及び肝細胞癌のモデルで単一のがん遺伝子の発現を一時的に抑制するのみで、腫瘍細胞の分化誘

導による治癒が観察され、がん遺伝子への依存ががんのアキレス腱であることが示された。また、ヒトがんにおいても、ＥＧＦＲ、Ｈｅｒ－２、Ｂｃｒ－Ａｂｌ等の単一のがん遺伝子を分子標的とする薬剤が開発され、がん臨床においてその有用性が示されている。本発明においては、ＡＤＡＴ１遺伝子を分子標的とする。ＡＤＡＴ１ががんにおいて分子標的となることは、本発明者らが初めて見出した事実である。

【００３５】

すなわち、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを使用してＲＮＡｉ効果によりＡＤＡＴ１遺伝子の発現を阻害することで、好ましくは、がん細胞の細胞増殖を抑制できる。これに対し、がん細胞以外の細胞は、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの影響を、好ましくは、受けない。なお、前記がんとしては、例えば、頭頸部癌が好ましい。

【００３６】

前述したとおり、従来、ｓｉＲＮＡを臨床応用する上で大きな問題が２つあった。すなわち、インターフェロン応答が誘導される問題と、オフターゲット効果の問題である。前記インターフェロン応答を回避するには、細胞内導入濃度を少なくとも１０ｎＭ未満とする必要があるが、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、好ましくは、１ｎＭという超低濃度でＡＤＡＴ１遺伝子に対して十分なＲＮＡｉ効果を発揮することができる。

【００３７】

また、前記オフターゲット効果についても、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの標的配列は、ＢＬＡＳＴサーチを駆使して他の遺伝子の非翻訳領域も含めた全配列にホモロジーを示さない配列であるため、オフターゲット効果を回避できる。このように、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、臨床応用における大きな２つの障壁をクリアしており、臨床応用可能である。なお、臨床応用においては、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、合成二本鎖ｓｉＲＮＡであることが好ましい。

【００３８】

したがって、本発明は、その他の態様として、ＲＮＡ干渉によりＡＤＡＴ１遺伝子の発現を特異的に阻害するＡＤＡＴ１特異的阻害組成物であって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを含む組成物である。本発明のＡＤＡＴ１特異的阻害組成物は、細胞内のＡＤＡＴ１遺伝子の発現を特異的にノックダウンするために、インビトロ及びインビボで使用できる。その剤形は、特に制限されない。

【００３９】

さらに、本発明は、その他の態様として、がん、好ましくは頭頸部癌、より好ましくは口腔癌の治療方法であって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを使用することを含むがんの治療方法を含む。本発明の治療方法は、既存の放射線及び/又は抗癌剤の使用と本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの使用とを併用することを好ましく含む。また、さらにその他の態様として、本発明は、がん、好ましくは頭頸部癌、より好ましくは口腔癌の治療における二本鎖ｓｉＲＮＡの使用であって、前記二本鎖ｓｉＲＮＡが、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡである使用を含む。同様に、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの使用は、既存の放射線及び/又は抗癌剤の使用との併用を好ましく含む。

【００４０】

次に、本発明の医薬組成物について説明する。本発明の医薬組成物は、がん治療用の医薬組成物であって、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡを含むものである。本発明の医薬組成物は、さらに、アテロコラーゲンを含むことが好ましい。上述のとおり、本発明の医薬組成物の治療用途の対象となるがんは、特に制限されないが、好ましくは頭頸部癌、より好ましくは口腔癌である。

【００４１】

本発明の医薬組成物は、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡが、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、リポソーム、カチオンリポソーム等があげられる。本発明の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等があげられる。また、投与方法

も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等があげられる。

【００４２】

次に、本発明の腫瘍マーカーについて説明する。本発明の腫瘍マーカーは、ＡＤＡＴ１遺伝子の発現をマーカーとして利用するものである。本発明において、「腫瘍マーカー」とは、悪性腫瘍細胞の目印（マーカー）になる物質であって、がんの診断や治療の判断基準として役立つ物質の総称をいう。本発明の腫瘍マーカーは、がん、好ましくは、頭頸部癌、より好ましくは、口腔癌の腫瘍マーカーである。本発明の腫瘍マーカーにおいて、マーカーとなる物質は、ＡＤＡＴ１遺伝子の転写産物であるＡＤＡＴ１ｍＲＮＡ、前記転写産物の翻訳産物であるＡＤＡＴ１タンパク質、及び、ＡＤＡＴ１タンパク質に対する自己抗体の少なくとも一つを含む。本発明の腫瘍マーカーにおいて、前記「被検試料」とは、特に制限されないが、例えば、リンパ節、唾液、血液などである。本発明の腫瘍マーカーにおいて、腫瘍マーカーが「陽性」であるとは、腫瘍マーカーの測定値が、所定のしきい値より大きい場合のことをいう。前記しきい値は、当該技術分野の当業者であれば、例えば、健常者や良性の腫瘍患者における前記腫瘍マーカーの数値を統計学的に処理した値に基づいて定めることができる。前記しきい値としては、例えば、健常者や良性の腫瘍患者等の平均の値の３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、及びそれ以上の値があげられる。

【００４３】

前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡの塩基配列は、前述のとおり、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号（２００６年１１月１７日付）ＮＭ＿０１２０９１に登録されており、ＡＤＡＴ１タンパク質のアミノ酸配列は、ＮＰ＿０３６２２３に登録されている。

【００４４】

次に、本発明の腫瘍マーカーの使用方法について説明する。本発明の腫瘍マーカーの使用方法としては、特に制限されず、従来公知の腫瘍マーカーと同様の使用方法にて使用できるが、例えば、被検者から被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に本発明の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する判定工程とを含む使用方法があげられる。まず、前記準備工程において、被検者から被検試料を準備する。次に、前記検出工程において、本発明の腫瘍マーカーのマーカー物質であるＡＤＡＴ１ｍＲＮＡ、ＡＤＡＴ１タンパク質、抗ＡＤＡＴ１タンパク質自己抗体の少なくとも１つを、例えば、従来公知の方法等を用いて検出し、最後に、前記判定工程において、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する。検出対象は１種類に限られず、２種類又は３種類を組み合わせて使用することも好ましい。

【００４５】

前記判定工程における本発明の腫瘍マーカーが陽性か陰性かの判定は、前述のとおり、例えば、健常者等の値を基準として設定するしきい値と比較して判定することができる。

【００４６】

本発明の腫瘍マーカーにおける前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡを検出する方法としては、特に制限されないが、前記ＲＮＡを定量できる従来公知の方法があげられる。その方法も特に制限されないが、例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ノーザンブロッティング、ドットプロット、ＲＮａｓｅプロテクションアッセイ等のほか、マイクロアレイを用いる方法、リアルタイムＰＣＲ法等のＰＣＲを利用する方法、前記ＲＮＡを直接測定する方法等の迅速な測定が可能な方法があげられる。前記定量は、前記判定工程において前記しきい値との比較ができる相対的な定量であってもよく、例えば、適当な内部標準や外部標準を利用することができる。

【００４７】

前記マイクロアレイを用いる方法としては、前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡに対応するプローブが配置されたマイクロアレイを準備し、このマイクロアレイに、前記被検試料中の前記ＡＤＡＴ１ｍＲＮＡを鋳型として調製した標識化ターゲットをハイブリダイズさせ、前記プローブに結合した前記ターゲットの標識シグナルを測定して前記ＲＮＡ鎖を定量する方

法があげられる。前記リアルタイムＰＣＲ法としては、例えば、被検試料のトータルＲＮＡから逆転写酵素を用いてｃＤＮＡを合成し、このｃＤＮＡを鋳型に前記マーカー転写産物領域をＰＣＲで増幅し、リアルタイムモニタリング用試薬を用いて増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングして解析する方法があげられる。また、前記ｍＲＮＡを直接測定する方法としては、例えば、Ｉｎｖａｄｅｒ（登録商標：Ｔｈｉｒｄ　Ｗａｖｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）ＲＮＡアッセイ等があげられる。ただし、前記ｍＲＮＡを検出する方法としては、これらの方法に限られず、種々の定量方法を適用できる。

【００４８】

本発明の腫瘍マーカーにおける前記ＡＤＡＴ１タンパク質を検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、前記ＡＤＡＴ１タンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的測定方法があげられる。前記免疫学的測定方法としては、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、サンドウィッチＥＬＩＳＡ、免疫組織化学染色等があげられる。前記抗体は、前記ＡＤＡＴ１タンパク質等を用いた従来公知の方法で作製してもよく、市販のものを購入してもよい。前記抗体は、ポリクローナルであっても、モノクローナルであってもよい。

【００４９】

本発明の腫瘍マーカーにおける前記ＡＤＡＴ１タンパク質に対する自己抗体を検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、前記自己抗体の抗原であるＡＤＡＴ１タンパク質を固相に固定化し、前記自己抗体と抗原抗体反応により複合体を形成させ、さらに、前記自己抗体に対する標識抗体により前記複合体を検出する方法等が挙げられる。

【００５０】

次に、本発明の検出キットについて説明する。本発明の検出キットは、本発明の腫瘍マーカーの検出するためのキットである。本発明の検出キットは、第１の態様として、前記マイクロアレイを含む検出キットが挙げられる。検出前記キットには、さらに、被検試料からトータルＲＮＡを調製するプライマーや試薬、ターゲットを調製するための標識化された本発明のプライマーや試薬等を含んでもよい。前記試薬としては、従来公知の試薬が利用でき、例えば、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、標識化合物、バッファー等があげられる。また、本発明の検出キットは、第２の態様として、前述のＰＣＲ等の遺伝子増幅技術を用いたＡＤＡＴ１ｍＲＮＡ検出及び／又は測定方法に使用するプローブやプライマーを含むキットが挙げられる。これらのプローブやプライマーの配列は、特に制限されず、当業者であれば容易に設定可能である。前記検出キットは、例えば、マイクロアレイを製造する場合や、リアルタイムＰＣＲ法により検出する場合に使用できる。さらに、本発明の検出キットは、第３の態様として、ＡＤＡＴ１タンパク質に対する抗体を含む検出キットが挙げられ、例えば、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ等の前記ポリペプチドの免疫学的測定に使用できる。第４の態様として、自己抗体の抗原であるＡＤＡＴ１タンパク質、及び、前記自己抗体に対する標識化抗体を含む検出キットが挙げられ、例えば、上述したとおり、自己抗体の免疫学的測定に使用できる。前記自己抗体を検出することで、間接的にＡＤＡＴ１遺伝子の発現を検出できる。前記ＡＤＡＴ１タンパク質は、固相に固定化されていることが好ましい。本発明の検出キットは、上述のいずれの態様においても検出方法などを記載した取扱説明書を含んでもよい。

【００５１】

さらに、本発明は、その他の態様として、がんの診断方法であって、本発明の腫瘍マーカーを使用することを含む診断方法であってもよい。また、本発明は、本発明の腫瘍マーカーの使用であって、がんの診断における本発明の腫瘍マーカーの使用を含む。前記診断対象のがんは、好ましくは、頭頸部癌であり、より好ましくは、口腔癌である。

【００５２】

以下、実施例を用いて本発明をさらに説明する。

【実施例１】

【００５３】

＜治療標的分子の同定（マイクロアレイ解析）＞

頭頸部癌腫瘍組織（９例）、正常上皮組織（３例）、培養ヒト頭頸部癌細胞株（１０株

）、及び、正常ヒト角化上皮細胞株（１株）をそれぞれホモジナイズした後、商品名：Ｉｓｏｇｅｎ（Ｎｉｐｐｏｎ　Ｇｅｎｅ社製）を用いてトータルＲＮＡを抽出し、精製した。２ｇのトータルＲＮＡを、商品名：ケミルミネッセントＲＴ－ＩＶＴラベリングキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて増幅し、ジゴキシゲニン（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ社製）標識ｃＲＮＡを合成した。合成ｃＲＮＡを、商品名：ヒトゲノムサーベイマイクロアレイ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）にハイブリダイゼーションさせたのち、商品名：ケミルミネッセントディテクションキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて洗浄、発色後、商品名：Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ１７００マイクロアレイアナライザー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）にて２９，０９８ヒト全遺伝子の発現定量を行った。各症例の遺伝子発現量の比較は、商品名：ＧｅｎｅＳｐｒｉｎｇ（Ｓｉｌｉｃｏｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ社製）を用いて解析した。

【００５４】

その結果、培養ヒト正常角化上皮細胞及び正常上皮組織には発現が認められず、培養ヒト頭頸部癌細胞及び頭頸部癌組織においてのみ共通して発現が認められる遺伝子として、ＡＤＡＴ１遺伝子を同定した。

【００５５】

＜本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡのＲＮＡｉ効果及び細胞増殖抑制効果の確認＞

上記表１の５種類の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡ（２６７、５２８、７５２、１０７４及び２１７２；それぞれ、配列表の配列番号１～５）と、３種類の２７塩基ブラントエンド二本鎖ｓｉＲＮＡ（７４９、１０７２及び２１６８；それぞれ、配列表の配列番号６～８）の８種類の二本鎖ｓｉＲＮＡを合成して調製し、それぞれの合成二本鎖ｓｉＲＮＡについて、１ｎＭの濃度で使用した場合のＡＤＡＴ１遺伝子に対するＲＮＡｉ効果及び細胞増殖抑制効果を確認した。具体的には、以下のようにして行った。

【００５６】

合成二本鎖ｓｉＲＮＡの調製

前記５種類の２１塩基オーバーハング二本鎖ｓｉＲＮＡ（２６７、５２８、７５２、１０７４及び２１７２）は、配列表の配列番号１～５の１９塩基の配列及びその相補配列それぞれの３’末端にＴＴ配列からなる２塩基オーバーハング部分を加えたＲＮＡ鎖を、定法により化学合成し、それらを対合させて調製した。また、前記３種類の２７塩基ブラントエンド二本鎖ｓｉＲＮＡ（７４９、１０７２及び２１６８）は、配列表の配列番号６～８の配列及びその相補配列のＲＮＡ鎖を定法により化学合成し、それらを対合させて調製した。以下のＲＮＡｉ効果及び細胞増殖抑制効果の確認に際しては、適宜、ＨＰＬＣ等で精製したものを使用した。

【００５７】

細胞及び培養法

ＲＮＡｉ効果の確認には、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株ＳＡＳに緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子を導入して分離したＧＦＰ安定発現株ＧＦＰ－ＳＡＳ細胞、及び、ヒト唾液腺癌細胞株ＡＣＣＭにＧＦＰ遺伝子を導入して分離したＧＦＰ安定発現株ＧＦＰ－ＡＣＣＭ細胞を用いた。前記細胞の培養には、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ；Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社製）、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、０．２５ｍｇ／ｍｌアンホテリシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を増殖培養液として用い、空気中に５％の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、３７℃で行った。

【００５８】

合成二本鎖ｓｉＲＮＡの細胞内導入

６０ｍｍ径プラスチックペトリ皿（商標：Ｆａｌｃｏｎ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）に、8×10^{5}個の前記ＧＦＰ－ＳＡＳ細胞又はＧＦＰ－ＡＣＣＭ細胞を植え込み、２４時間培養後ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）にて２回洗浄し、１

ｎＭの合成二本鎖ｓｉＲＮＡを含むＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）溶液を加えた。５時間後１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭに培地交換した。

【００５９】

ウエスタンブロッティング法

上述のとおり、合成二本鎖ｓｉＲＮＡを導入後４８時間培養した後に、培養した細胞を、商品名：ＣｅｌＬｙｔｉｃ Ｍ Ｃｅｌｌ Ｌｙｓｉｓ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を用いて可溶化した。前記可溶化試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動）にて展開し、商品名：Ｍｉｎｉ－ＰＲＯＴＥＡＮ ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）を用いて、２時間ＰＤＶＦ（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅ ｄｉｆｕｏｅｉｄｅ）膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）に転写した。転写後は、５％スキムミルク（和光純薬社製）を含むＴ－ＴＢＳ（２５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１２５ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）にて４℃、１晩ブロッキングした。さらに、一次抗体をブロッキング溶液にて希釈し、室温にて１時間反応させ、前記Ｔ－ＴＢＳ溶液にて３回洗浄後、二次抗体を同様に１時間反応させた。商品名：ＥＣＬｐｌｕｓキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）にて発色させた後、商品名：ＬＡＳ３０００（富士フィルム社製）を用いてデジタル画像化した。

【００６０】

細胞増殖評価法

前記ＧＦＰ－ＳＡＳ細胞に前記合成二本鎖ｓｉＲＮＡを導入した細胞を、６ウェルマイクロプレート（商標：Ｆａｌｃｏｎ、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）に5×10^4個植え込み、４日間培養した後、０．０５％トリプシン－０．５３ｍＭ ＥＤＴＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）にて細胞を回収し、商品名：Ｚ１ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ社製）を用いて細胞数を計測した。

【００６１】

＜ＲＮＡｉ効果についての結果＞

前記８種類の合成二本鎖ｓｉＲＮＡを前記培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株ＧＦＰ－ＳＡＳ細胞、及び、前記培養ヒト唾液腺癌細胞株ＧＦＰ－ＡＣＣＭ細胞に導入し、ＲＮＡｉ効果をＡＤＡＴ１タンパク質の発現レベルで評価した。その結果、前記８種類の全ての合成二本鎖ｓｉＲＮＡが、１ｎＭの濃度で標的遺伝子ＡＤＡＴ１の発現を有意に抑制することが確認された。その結果の一例を図１に示す。同図は、ＧＦＰ－ＳＡＳ及びＧＦＰ－ＡＣＣＭに、５種類の２１塩基オーバーハング合成二本鎖ｓｉＲＮＡ（２６７、５２８、７５２、１０７４及び２１７２）を導入した４８時間後にＲＮＡｉ効果を確認した結果の一例である。それぞれ、上段が、ＡＤＡＴ１タンパク質に対するウエスタンブロッティングの結果を示し、下段が、内部対照マーカーであるβ－チューブリンに対するウエスタンブロッティングの結果を示す。また、同図において、ＧＦＰのレーンは、ＧＦＰ遺伝子に対する合成二本鎖ｓｉＲＮＡ（２１塩基オーバーハング）を導入した場合のコントロールである。同図に示すとおり、導入した本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、ＡＤＡＴ１に対してＲＮＡｉ効果を示した。

【００６２】

＜細胞増殖抑制効果についての結果＞

前記８種類の合成二本鎖ｓｉＲＮＡを前記培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株ＧＦＰ－ＳＡＳに導入し、上述のとおり、細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、前記８種類の全ての合成二本鎖ｓｉＲＮＡが、１ｎＭの濃度で前記口腔癌細胞の増殖を有意に抑制することが確認された。その結果の一例を図２に示す。同図において、“－”のレーンは、ｓｉＲＮＡを導入しなかった場合のコントロールであり、左から２番目の“ＧＦＰ”のレーンは、ＧＦＰを標的とした２１塩基オーバーハングｓｉＲＮＡを導入した場合のコントロールであり、右から４番目の“ＧＦＰ”のレーンは、ＧＦＰを標的とした２７塩基ブラントエンドｓｉＲＮＡを導入した場合のコントロールである。また、同図において、縦軸は、前記ｓｉＲＮＡを導入しなかった場合の細胞数を１とした場合の相対的な細胞数を示す。同

図に示すとおり、前記８種類の中でも、２１７２、１０７２、及び、２１６８の３種類の合成二本鎖ｓｉＲＮＡは、７０％以上の顕著な頭頸部癌細胞の増殖抑制効果を示した。

【産業上の利用可能性】

【００６３】

以上説明したとおり、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、オフターゲット効果及びインターフェロン応答を回避しつつ、ＡＤＡＴ１遺伝子特異的なＲＮＡｉを媒介できるから、例えば、臨床応用が可能であり、ＡＤＡＴ１を標的分子とした医療や医薬組成物の分野、例えば、頭頸部癌を含むがん治療に関する治療や医薬組成物の分野で有用である。その他、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡは、例えば、学術及び基礎医学的研究開発分野においても有用である。

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【図１】図１は、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡのＡＤＡＴ１遺伝子を標的としたＲＮＡｉ効果をウエスタンブロッティングで確認した結果の一例である。

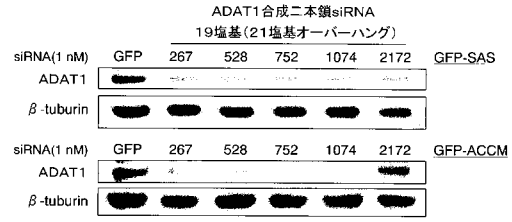
【図２】図２は、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡの頭頸部癌細胞に対する増殖抑制効果を確認した結果の一例である。

【配列表フリーテキスト】

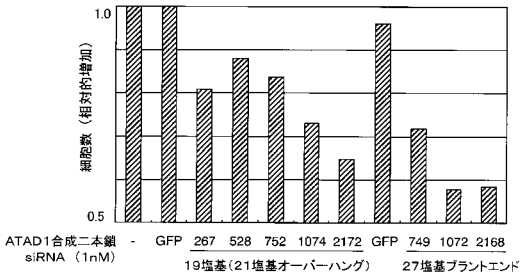
【００６５】

配列番号１　オーバーハングｓｉＲＮＡ　２６７
配列番号２　オーバーハングｓｉＲＮＡ　５２８
配列番号３　オーバーハングｓｉＲＮＡ　７５２
配列番号４　オーバーハングｓｉＲＮＡ　１０７４
配列番号５　オーバーハングｓｉＲＮＡ　２１７２
配列番号６　ブラントエンドｓｉＲＮＡ　７４９
配列番号７　ブラントエンドｓｉＲＮＡ　１０７２
配列番号８　ブラントエンドｓｉＲＮＡ　２１６８

【図１】



【図２】



【配列表】

2008228655000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/42	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 47/42	

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR59
QR62 QS25 QX02
4C076 CC27 EE43 FF68
4C084 AA13 NA14 ZB212 ZB262